

## NEW NUCLEIC ACID PROBE AND NEW METHOD FOR ASSAYING NUCLEIC ACID USING THE SAME

**Publication number:** JP2002355084  
**Publication date:** 2002-12-10  
**Inventor:** KURANE RYUICHIRO; KANEKAWA TAKAHIRO;  
KAMAGATA YOICHI; TORIMURA MASAMOTO;  
KURATA SHINYA; YAMADA KAZUTAKA; YOKOMAKU  
TOYOICHI  
**Applicant:** NAT INST OF ADV IND & TECHNOL; KANKYO ENG  
CO LTD  
**Classification:**  
- **International:** G01N21/64; C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/53;  
G01N33/566; G01N33/58; G01N21/64; C12N15/09;  
C12Q1/68; G01N33/53; G01N33/566; G01N33/58;  
(IPC1-7): C12N15/09; C12Q1/68; G01N21/64;  
G01N33/53; G01N33/566; G01N33/58  
- **European:**  
**Application number:** JP20020088887 20020327  
**Priority number(s):** JP20020088887 20020327; JP20010090556 20010327

**Report a data error here**

### Abstract of JP2002355084

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide both a new nucleic acid probe for simultaneously assaying target nucleic acids with a simple apparatus when one more kinds of the target nucleic acids are present in the assaying system and a new method for assaying the nucleic acids using the probe.  
**SOLUTION:** This new nucleic acid probe for assaying the nucleic acids is characterized in that a base sequence is designed so as to reduce fluorescence intensities of both a donor dye and an acceptor dye when the probe is hybridized to the target nucleic acids and the dye is labeled in the single-stranded nucleic acid probe labeled with a plurality of fluorescent dyes so as to form at least one pair of fluorescent dyes causing a Forster resonance energy transfer (FRET) phenomenon, i.e., the pair of the fluorescent dye (the donor dye) convertible into the donor dye and the fluorescent dye (the acceptor dye) convertible into the acceptor dye. The new method for assaying the nucleic acids uses the probe.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2002-355084  
(P2002-355084A)

(43) 公開日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 4 3
C 1 2 Q 1/68		C 0 1 N 21/64	C 2 G 0 4 3
G 0 1 N 21/64			F 4 B 0 2 4
		33/53	M 4 B 0 6 3
33/53		33/566	
審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 20 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2002-88887(P2002-88887)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(22) 出願日	平成14年3月27日 (2002. 3. 27)	(71) 出願人	000156581 環境エンジニアリング株式会社 東京都千代田区東神田一丁目9番8号
(31) 優先権主張番号	特願2001-90556(P2001-90556)	(72) 発明者	倉根 隆一郎 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内
(32) 優先日	平成13年3月27日 (2001. 3. 27)	(74) 代理人	10007/698 弁理士 吉田 勝広 (外1名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規核酸プローブおよびそれを用いる新規核酸測定方法

## (57) 【要約】

【課題】 測定系に少なくとも一種以上の標的核酸が存在する場合に、単純な装置で標的核酸を同時に測定するための新規核酸プローブ、およびそのプローブを用いた新規核酸測定方法を提供する。

【解決手段】 FRET現象を引き起こす蛍光色素ペアすなわちドナー色素になり得る蛍光色素（ドナー色素）とアクセプター色素になり得る蛍光色素（アクセプター色素）のペアを少なくとも一ペアを形成するように複数の蛍光色素で標識された一本鎖の核酸プローブにおいて、当該プローブが標的核酸にハイブリダイズしたときに、アクセプター色素の蛍光強度が共に減少するように塩基配列が設計され、かつ前記色素が標識されていることを特徴とする核酸測定用の新規核酸プローブ、およびそのプローブを用いた新規核酸測定方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 FRET現象を引き起こす蛍光色素ベアースなわちドナー色素になり得る蛍光色素（ドナー色素）とアクセプター色素になり得る蛍光色素（アクセプター色素）のベアースを少なくとも一ベアースを形成するように複数の蛍光色素で標識された一本鎖の核酸プローブにおいて、当該プローブが標的核酸にハイブリダイズしたときに、アクセプター色素の蛍光強度が減少するように塩基配列が設計され、かつ前記色素が標識されていることを特徴とする核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項2】 ドナー色素およびアクセプター色素の蛍光強度が共に減少する請求項1に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項3】 ドナー色素となり得る蛍光色素がBODIPY FL、BODIPY 493/503、5-FAM、Tetramethylrhodamine、または6-TAMRAである請求項1または2に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項4】 ドナー色素とアクセプター色素の一对の色素ベアースを有する請求項1～3のいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項5】 核酸プローブが、その末端部においてドナー色素で標識されており、当該核酸プローブが当該末端部において標的核酸にハイブリダイズしたとき、当該プローブにハイブリダイズした標的核酸の末端塩基から1ないし3塩基離れて、標的核酸の塩基配列にG（グアニン）が少なくとも1塩基存在するように、当該プローブの塩基配列が設計されている請求項1～4のいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項6】 核酸プローブが、標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、ドナー色素標識部においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのG（グアニン）とC（シトシン）のベアースを形成するように、当該プローブの塩基配列が設計されている請求項1～5のいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項7】 ドナー色素が核酸プローブの5'末端部（5'末端を含む。）を標識している請求項1～6のいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項8】 ドナー色素が核酸プローブの3'末端部（3'末端を含む。）を標識している請求項1～7のいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項9】 核酸プローブの5'末端塩基がGまたはCで、かつ5'末端がドナー色素で標識されている請求項7に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項10】 核酸プローブの3'末端塩基がGまたはCで、かつ3'末端がドナー色素で標識されている請求項8に記載の核酸測定用の新規核酸プローブ。

【請求項11】 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系に、請求項1～10の少なくともいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブであって、当

該標的核酸にハイブリダイズする核酸測定用の新規核酸プローブで、かつ標的核酸の種の数と少なくとも同数の種の数でかつ発光蛍光色の異なる核酸測定用の新規核酸プローブを存在させ、核酸測定用の新規核酸プローブと標的核酸をハイブリダイズさせて、核酸測定用の新規核酸プローブの種の数と少なくとも同数の種の数で、ハイブリダイゼーション前後における測定波長の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とする新規核酸測定方法。

【請求項12】 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系における標的核酸の濃度を測定するキットにおいて、請求項1～10の少なくともいずれか一項に記載の核酸プローブを含有または付帯することを特徴とする核酸測定用キット。

【請求項13】 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系における標的核酸の多型（polymorphism）または／および変異（mutation）を解析もしくは測定する方法において、請求項1～10の少なくともいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブであって、標的核酸の種の数と少なくとも同数の種の数で、かつ発光蛍光色の異なる核酸測定用の新規核酸プローブを測定系に存在させ、標的核酸と核酸測定用の新規核酸プローブをハイブリダイズさせて、核酸測定用の新規核酸プローブの種の数と少なくとも同数の種の数で、ハイブリダイゼーション前後における測定波長の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とする標的核酸の多型または／および変異を解析もしくは測定する方法。

【請求項14】 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系の標的核酸の多型または／および変異を解析もしくは測定する測定キットにおいて、請求項1～10の少なくともいずれか一項に記載の核酸測定用の新規核酸プローブを含有または付帯することを特徴とする標的核酸の多型または／および変異を解析もしくは測定するための測定キット。

【請求項15】 請求項11または13に記載の核酸測定方法において、標的核酸が、純粋分離して得た微生物由来、または動物由来であることを特徴とする核酸測定方法。

【請求項16】 標的核酸が、複合微生物系、または共生微生物系の細胞内もしくは細胞のホモジネートに含まれる核酸である請求項11または13に記載の核酸測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、測定系に少なくとも一種以上（すなわち、単数または複数）の標的核酸が存在する場合に、単純な装置で系内に存在する標的核酸を測定する（複数の標的核酸が存在する場合は同時に測定する）ための新規核酸プローブ、そのプローブを用いた新規核酸測定方法などに関する。

【0002】詳しくはForster(またはfluorescence) resonance energy transfer (以下FRETという。)現象を引き起こす蛍光色素ペアすなわちドナー色素になり得る蛍光色素(以下、ドナー色素という。)とアクセプター色素になり得る蛍光色素(以下、アクセプター色素という。)のペアを少なくとも一ペアを形成するように複数の蛍光色素で標識された一本鎖の核酸測定用の新規核酸プローブ、当該核酸プローブを用いる核酸測定方法、その方法に用いる核酸測定用試薬キット、および標的核酸の多型(polymorphism)または/および変異(mutation)を解析もしくは測定する方法、ならびにそれを利用する測定キット、などに関する。

#### 【0003】

【従来の技術】一本鎖のオリゴヌクレオチドに、FRET現象を引き起こす蛍光色素ペアすなわちドナー色素であるフルオレセインとアクセプター色素であるX-ローダミンを結合した核酸プローブは知られている(実験医学、15巻(No. 7、増刊号)、728~733、1997年)。しかしこの核酸プローブは、PCR方法のモニタリングに使用するものであり、直接核酸を測定することを目的としたものではない。

【0004】標的核酸の検出に利用された例もある(Biochemistry、34巻、285~292頁、1995年)。この場合においては、核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしていないときは、FRET現象により当該核酸プローブ自体の蛍光強度は低いレベルにある。すなわち、フルオレセインの発光は抑制されて、蛍光強度は低いレベルにある。一方、X-ローダミンの蛍光強度は高いが、フルオレセインの抑制された発光程ではない。しかし、この核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズすると、プローブの立体構造が変化し、FRET現象が解消する。その結果として、フルオレセインの発光が増加して、反応系の蛍光強度が増加する。しかしながら、ハイブリダイゼーション後、核酸プローブの立体構造が変化しない場合は蛍光強度に変化が生じないことになり、蛍光強度は核酸測定に適したものではなかった。

【0005】本発明者らは、他の核酸プローブの介在なしに、標的核酸とハイブリダイズしたときに当該ハイブリダイゼーション後蛍光発色が減少する蛍光消光プローブなる核酸プローブを開発してきた(Nucleic Acid、29巻、No1.6e34、2001年; EP1046 717 A9; 特開2001-286300(P2001-286300A))。この核酸プローブは一本鎖のオリゴヌクレオチドの末端部に蛍光色素が標識されていて、標的核酸にハイブリダイズすると、蛍光強度が減少するように蛍光色素と塩基配列が設計されている。この核酸プローブは標的核酸を微量で正確、簡便に測定できる。しかしながら、本従来方法は、二本鎖オリゴヌクレオチド形成時におけるG(グアニン)とC(シトシン)の塩基対複合体(水素結合体)と蛍光色素の相互作用による蛍光消光(当該複合体への発光エネルギー転移によ

る消光)現象を利用したものであり、本現象により消光するような蛍光色素は比較的少ないために使用可能な蛍光発光色が限定される。

【0006】測定系に多種類の標的核酸が存在する場合、これらを全て同時測定するためには、標的核酸と同数の蛍光発光色を必要とする。言い換えると、標的核酸種と同数の蛍光発光色の異なる核酸プローブを必要とする。本従来方法において、蛍光発光色を増やすためには、前記GCの水素結合体と蛍光色素の相互作用が発生しかつ蛍光発光色の異なる蛍光色素を増やすことが必要となるが、使用可能な蛍光発光色が限られるため、これまで複数(特に3種以上)の標的核酸種を同時検出するには限界があった。さらに、蛍光色素が異なるということは、励起波長も異なるということを意味し、それらの蛍光色素を全て励起するためには、励起光源が多数必要になることを意味し、装置が大掛かりとなるために非経済的であった。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、前記の状況に鑑み、一本鎖のオリゴヌクレオチドにFRET現象を引き起こす蛍光色素ペアすなわちドナー色素とアクセプター色素を結合した核酸プローブにおいて、簡単な測定装置で、少なくとも一種以上(すなわち、単数または複数)の標的核酸を同時に測定でき、かつ微量で、短時間、簡便、正確に測定できる核酸測定用の新規核酸プローブ(以下、核酸測定用の新規核酸プローブを単に核酸プローブという場合がある。)を提供することである。さらに、それを用いた新規核酸測定方法(以下、単に核酸測定方法という場合がある。)ならびにその試薬キット、および標的核酸の多型・変異の測定方法ならびにその測定キットなどを提供することである。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するにあたり、前記蛍光消光プローブを基本に、試行錯誤的に一本鎖オリゴヌクレオチドを種々の蛍光色素を用いて、オリゴヌクレオチドの2箇所を標識して作製した種々の核酸プローブについて詳しく比較検討した。その結果、特定のドナー色素とそれと対をなすアクセプター色素を用いてオリゴヌクレオチドの特定の位置を標識すると、その核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズすると、ハイブリダイゼーション前後でプローブ・核酸複合体(核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしたもの)におけるアクセプター色素の蛍光強度が著しく減少するか、またはドナーおよびアクセプター色素の蛍光強度が共に著しく減少するということを知見した。本発明はかかる知見に基づいて完成されたものである。

#### 【0009】すなわち、本発明は、

1. FRET現象を引き起こす蛍光色素ペアすなわちドナー色素になり得る蛍光色素(以下、ドナー色素とい

う。)とアクセプター色素になり得る蛍光色素(以下、アクセプター色素という。)のペアを少なくとも一ペアを形成するように複数の蛍光色素で標識された一本鎖の核酸プローブにおいて、当該プローブが標的核酸にハイブリダイズしたときに、アクセプター色素の蛍光強度が減少するように塩基配列が設計され、かつ前記色素が標識されていることを特徴とする核酸プローブ、また、

2. ドナー色素およびアクセプター色素の蛍光強度が共に減少する前記1に記載の核酸プローブ、また、

【0010】3. ドナー色素となり得る蛍光色素がBODIPY FL、BODIPY 493/503、5-FAM、Tetramethylrhodamine、または6-TAMRAである前記1または2に記載の核酸プローブ、また、

4. ドナー色素とアクセプター色素の一对の色素ペアを有する前記1〜3のいずれかに記載の核酸プローブ、また、

【0011】5. 核酸プローブが、その末端部においてドナー色素で標識されており、当該核酸プローブが当該末端部において標的核酸にハイブリダイズしたとき、当該プローブにハイブリダイズした標的核酸の末端塩基から1ないし3塩基離れて、標的核酸の塩基配列にG(グアニン)が少なくとも1塩基存在するように、当該プローブの塩基配列が設計されている前記1〜4のいずれかに記載の核酸プローブ、また、

6. 核酸プローブが、標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、ドナー色素標識部においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのG(グアニン)とC(シトシン)のペアを形成するように、当該プローブの塩基配列が設計されている前記1〜5のいずれかに記載の核酸プローブ、また、

【0012】7. ドナー色素が核酸プローブの5'末端部(5'末端を含む。)を標識している前記1〜6のいずれかに記載の核酸プローブ、また、

8. ドナー色素が核酸プローブの3'末端部(3'末端を含む。)を標識している前記1〜7のいずれかに記載の核酸プローブ、また、

9. 核酸プローブの5'末端塩基がGまたはCで、かつ5'末端がドナー色素で標識されている前記7に記載の核酸プローブ、また、

10. 核酸プローブの3'末端塩基がGまたはCで、かつ3'末端がドナー色素で標識されている前記8に記載の核酸プローブ、また、

【0013】11. 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系に、前記1〜10の少なくともいずれかに記載の核酸プローブであって、当該標的核酸にハイブリダイズする核酸プローブで、かつ標的核酸の種類(以下、単に種ともいう。)の数と少なくとも同数の種の数でかつ発光蛍光色の異なる核酸プローブを存在させ、核酸プローブと標的核酸をハイブリダイズさせて、核酸プ

ローブの種類(以下、単に種ともいう。)の数と少なくとも同数の種類(以下、単に種ともいう。)の数の波長で、ハイブリダイゼーション前後における測定波長の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とする核酸測定方法、また、

12. 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系における標的核酸の濃度を測定するキットにおいて、前記1〜10の少なくともいずれかに記載の核酸プローブを含有または付帯することを特徴とする核酸測定用キット、また、

【0014】13. 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系における標的核酸の多型(polymorphism)または/および変異(mutation)を解析もしくは測定する方法において、前記1〜10の少なくともいずれかに記載の核酸プローブであって、標的核酸の種の数と少なくとも同数の種の数で、かつ発光蛍光色の異なる核酸プローブを測定系に存在させ、標的核酸と核酸プローブをハイブリダイズさせて、核酸プローブの種の数と少なくとも同数の種の数で、ハイブリダイゼーション前後における測定波長の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とする標的核酸の多型または/および変異を解析もしくは測定する方法、また、

14. 少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系の標的核酸の多型または/および変異を解析もしくは測定する測定キットにおいて、前記1〜10の少なくともいずれかに記載の核酸プローブを含有または付帯することを特徴とする標的核酸の多型または/および変異を解析もしくは測定するための測定キット、また、

【0015】15. 前記11または13に記載の核酸測定方法において、標的核酸が、純粋分離して得た微生物由来、または動物由来であることを特徴とする核酸測定方法。

16. 標的核酸が、複合微生物系、または共生微生物系の細胞内もしくは細胞のホモジネートに含まれる核酸である前記11または13に記載の核酸測定方法、を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】次に好ましい実施の形態を挙げて本発明を更に詳細に説明する。本発明の第1発明は、FRET現象を引き起こす蛍光色素ペアすなわちドナー色素とアクセプター色素のペアを少なくとも一ペアを形成するように複数の蛍光色素で標識された一本鎖の核酸プローブにおいて、当該プローブが標的核酸にハイブリダイズしたときに、プローブ-核酸ハイブリッド複合体のアクセプター色素の蛍光強度が減少するように、前記蛍光色素が標識され、かつ塩基配列が設計されていることを特徴とする核酸プローブである。その中でも好ましい核酸プローブは、ドナーおよびアクセプター色素の蛍光強度が共に減少するように設計されたものである。

【0017】本発明において、プローブ-核酸ハイブリ

ッド複合体とは、本発明の核酸プローブが標的核酸とハイブリダイズした状態のもの（複合体）のことを云う。そして簡便化のために、以下、核酸ハイブリッド複合体と略称する。

【0018】また、本発明において、DNA、RNA、cDNA、mRNA、rRNA、XTPs、dXTPs、NTPs、dNTPs、核酸プローブ、ヘルパー核酸プローブ（または核酸ヘルパープローブ、または単にヘルパープローブ）、ハイブリダイズ、ハイブリダイゼーション、インターカレーター、プライマー、アニーリング、伸長反応、熱変性反応、核酸融解曲線、PCR、RT-PCR、RNA-primed PCR、Stretch PCR、逆PCR、Alu配列を利用したPCR、多重PCR、混合プライマーを用いたPCR、PNAを用いたPCR法、ハイブリダイゼーションアッセイ方法（hybridization assays）、FISH（fluorescent in situ hybridization assays）方法、PCR方法（polymerase chain assays）、LCR方法（ligase chain reaction）、SD方法（strand displacement assays）、競合的ハイブリダイゼーション方法（competitive hybridization）、DNAチップ、核酸検出用（遺伝子検出用）デバイス、SNP（スニップ：一塩基置換多型）、複合微生物系等の用語は、現在、分子生物学、遺伝子工学、微生物工学等で一般的に使用されている用語と同じ意味である。

【0019】本発明において核酸測定とは、標的核酸を定量をすることもしくは定量的検出をすること、または単なる検出をすることを云う。本発明において標的核酸とは、核酸測定を目的とする核酸もしくは遺伝子のことをいう。精製の有無を問わない。また、濃度の大小も問わない。標的核酸以外の各種の核酸が混在していてもよい。そして、測定系には、少なくとも一種以上の標的核酸が存在する。例えば、複合微生物系（複数微生物のRNAもしくは遺伝子DNAの混在系）または共生微生物系（複数の動植物および／または複数の微生物のRNAもしくは遺伝子DNAの混在系）における測定を目的とする少なくとも一種以上の特定核酸である。尚、標的核酸の精製が必要な場合は従来公知の方法で行うことができる。例えば、市販されている精製キット等を使用して行うことができる。上記の核酸の具体例として、DNA、RNA、PNA、オリゴデオキシリボヌクレオチド（oligodeoxyribonucleotides）、オリゴリボヌクレオチド（oligoribonucleotides）等、また、前記核酸の化学的修飾核酸を挙げることができる。化学的修飾核酸として2'-O-メチル（Me）RNA等を例示することができる。

【0020】本発明におけるFRET現象においてドナー色素となり得るドナー色素とは、少なくとも、a. 特定波長で励起され、特定波長で発光する、b. 発光エネルギーを特定の色素（アクセプター色素になり得る色素）に転移することができる、c. 核酸プローブが標的核酸と

ハイブリダイズしたときに生ずるGC塩基対の複合体（GC塩基対の水素結合体）（以下簡便のため、GC水素結合体という場合もある。）、ドナー色素の近傍に存在するときは当該塩基対の方へエネルギーを転移することができる、などの条件を充たすものと定義される。すなわち、この条件を充たす色素であればどのようなものでもよい。一般に、FRET現象においてドナー色素となり得る色素で、それ自体を単独で標識した核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしたときにプローブ-核酸ハイブリッド複合体の蛍光強度が減少するものが好適に用いられる（Nucleic Acid、29巻、No.6e34、2001年）。例えば、ドナー色素としては、BODIPY FL（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、BODIPY 493/503（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、5-FAM、Tetramethylrhodamine、6-TAMRA、フルオレセイン（fluorescein）またはその誘導体類（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate）（FITC）もしくはその誘導体等、Alexa 488、Alexa 532、cy3、cy5、EDANS（5-（2'-aminoethyl）amino-1-naphthalene sulfonic acid））、ローダミン（rhodamine）6G（R6G）またはその誘導体（例えば、テトラメチルローダミンイソチオシアネート（tetramethylrhodamine isothiocyanate）（TMRITC）、ボデビー（BODIPY）FL/C3（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデビー（BODIPY）FL/C6（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデビー（BODIPY）5-FAM（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデビー（BODIPY）TMR（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、またはその誘導体（例えば、ボデビー（BODIPY）TR（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデビー（BODIPY）R6G（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデビー（BODIPY）564（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、ボデビー（BODIPY）581/591（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）等を挙げることができる。

【0021】前記の中でも好適なドナー色素として、BODIPY FL（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、BODIPY FL系の前記色素（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、BODIPY 493/503（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、5-FAM、ボデビー（BODIPY）5-FAM（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、Tetramethylrhodamine、6-TAMRAなどを、より好適なものとして、BODIPY FL（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、BODIPY 493/503（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、5-FAM



M、Tetramethylrhodamine、6-TAMRAなどを挙げる事ができる。しかしながら、本発明において、これらの例示に限定されるものではない。

【0022】またアクセプター色素は一般にFRET現象において、ドナー色素との対において、アクセプター色素となり得る色素、すなわち、ドナー色素からエネルギー転移を受け得る（言葉を換えるとドナー色素に対してクエンチング（消光作用）作用をする）色素であればどのようなものでもよい。そして、対を形成するドナー色素の種類に依存する。強いて例示するならば、BODIPY FL（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、BODIPY FL系の前記色素（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、BODIPY 493/503（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、5-FAM、ボデビー（BODIPY）5-FAM（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）、Tetramethylrhodamine、6-TAMRAなどをドナー色素とするならば、X-ローダミン（rhodamine）、BODIPY 581/591（商標名；モレキュラー・プローブ（Molecular Probes）社製、米国）などをアクセプター色素とすることができる。しかしながら、本発明において、これらの例示に限定されるものではない。

【0023】標的核酸にハイブリダイズさせる本発明の核酸プローブは、オリゴデオキシリボヌクレオチドで構成されていてもよいし、オリゴリボヌクレオチドで構成されていてもよい。また、それらの両方を含むキメリックオリゴヌクレオチド（chimeric oligonucleotide）でもよい。それらのオリゴヌクレオチドは化学的修飾を受けたものでもよい。化学的修飾を受けたオリゴヌクレオチドをキメリックオリゴヌクレオチドの鎖中に介在させてもよい。

【0024】前記の化学的修飾を受けたオリゴヌクレオチドの修飾部位として、オリゴヌクレオチド末端部の末端水酸基もしくは末端リン酸基、インターヌクレオシドリン酸部位、ピリミジン環の5位の炭素、ヌクレオシドの糖（リボースもしくはデオキシリボース）部位を挙げることができる。好適にはリボースもしくはデオキシリボース部位を挙げることができる。具体的には、2'-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド（2'-O-alkyloligoribonucleotides）（以下、2'-O-を2-O-に略記する。）、2-O-アルキレンオリゴリボヌクレオチド（2-O-alkyleneoligoribonucleotides）、2-O-ベンジルオリゴリボヌクレオチド（2-O-benzyloligoribonucleotides）を例示することができる。当該オリゴヌクレオチドは、オリゴリボヌクレオチドの任意の位置の単数もしくは複数のリボースの2'位炭素のOH基がアルキル基、アルキレン基もしくはベンジル基で修飾（エーテル結合で）されているものである。本発明においては、好適には、2-O-アルキルオリゴリボヌクレオチドのなかでも、2-O-メチルオリ

ゴリボヌクレオチド、2-O-エチルオリゴリボヌクレオチド、2-O-ブチルオリゴリボヌクレオチド、2-O-ベンジルオリゴリボヌクレオチドが、2-O-アルキレンオリゴリボヌクレオチドの中では、2-O-エチレンオリゴリボヌクレオチドが、および2-O-ベンジルオリゴリボヌクレオチドが、特に好適には、2-O-メチルオリゴリボヌクレオチド（以下、単に2-O-Meオリゴリボヌクレオチドと略記する。）が用いられる。このような化学的修飾を、オリゴヌクレオチドに施すことにより、標的核酸との親和性が高まり、本発明の核酸プローブのハイブリダイゼーション効率が向上する。ハイブリダイゼーション効率が高まると、本発明の核酸プローブの蛍光色素の蛍光強度の減少率が更に向上するので、標的核酸の濃度の測定精度が更に向上する。なお、本発明において、オリゴヌクレオチドなる用語は、オリゴデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドもしくはその双方を意味するもので、それらを総称するものとする。2-O-アルキルオリゴリボヌクレオチド、2-O-アルキレンオリゴリボヌクレオチド、2-O-ベンジルオリゴリボヌクレオチドは、公知の方法（Nucleic Acids Research、26巻、2224～2229ページ、1998年）で合成できる。また、GENSET（株式会社）（フランス）が委託合成を行っているので、容易に入手できる。本発明者らは当該会社に出発化合物の合成を委託して実験を行って、本発明を完成した。

【0025】尚、2-O-メチルオリゴリボヌクレオチド（以下、単に2-O-Meオリゴリボヌクレオチドという。）のような修飾されたRNAをオリゴデオキシリボヌクレオチドの中に介在させた本発明の核酸プローブは主にRNA特にrRNAの測定に用いると好ましい結果が得られる。本発明の核酸プローブを使用してRNAを測定する場合、当該プローブとハイブリダイズさせる前に、試料であるRNA溶液を、80～100℃、好ましくは90～100℃、最適には93～97℃で、1～15分間、好ましくは2～10分間、最適には3～7分間、加熱処理してRNAの高次構造を破壊することがハイブリダイゼーション効率を向上させるのに好適である。

【0026】更に、本発明の核酸プローブの、ハイブリダイゼーション塩基配列領域へのハイブリダイゼーション効率を更に上げるためにヘルパープローブ（helper probe）をハイブリダイゼーション反応溶液に添加することが好適である。この場合、ヘルパープローブのオリゴヌクレオチドはオリゴデオキシリボヌクレオチド、オリゴリボヌクレオチドでも、また、前記と同様な化学的修飾を受けたオリゴヌクレオチドでもよい。前記のオリゴヌクレオチドの一例として、PCR方法においてはフォワード（forward）型として（5'）TCCTTTGAGT TCCCGCCG G A（3'）、バックワード（back ward）型もしくはリバース（reverse ward）型として（5'）CCCTGGTCGT AAGGGCCA TG ATGACTTGAC GT（3'）なる塩基配列のものを挙げるこ

ができる。化学的修飾を受けたオリゴヌクレオチドの好適な例として、2-0-アルキルオリゴリボヌクレオチド、特に2-0-Meオリゴリボヌクレオチドを例示できる。

【0027】本発明の核酸プローブの塩基鎖が35塩基以下の場合、ヘルパープローブの利用は、特に効果的である。35塩基鎖を超える本発明の核酸プローブを使用する場合は、標的のRNAを熱変性するだけでよい場合もある。前記のようにして、本発明の核酸プローブをRNAにハイブリダイズさせると、ハイブリダイゼーション効率が高まるので反応液中のRNAの量に応じて蛍光強度が減少し、最終RNA濃度が約150pMまでRNAを測定できるようになる。かくして、本発明は、標的核酸の種の数と少なくとも同数以上の本発明の核酸プローブを含有もしくは付帯する、少なくとも一種以上（すなわち単数または複数）の標的核酸の濃度を測定する測定キットに前記のヘルパープローブを含有、付帯させてなる、少なくとも一種以上（すなわち単数または複数）の標的核酸の濃度を測定する測定キットでもある。

【0028】核酸プローブを用いる従来のハイブリダイゼーション方法によるRNAの測定において、核酸プローブとしてオリゴデオキシリボヌクレオチド体またはオリゴリボヌクレオチド体が用いられてきた。RNAはそれ自体が強固な高次構造をとるため、プローブと標的RNAとのハイブリダイゼーション効率が悪く、定量性に乏しかった。そのために、RNAを変性させた後、メンブランに固定してからハイブリダイゼーション反応を行うという複雑性を従来方法は有していた。これに対して、前記の本発明方法は、RNAの特定構造部と高い親和性を有するリボース部修飾核酸プローブを用いているので、従来方法に較べて高い温度でハイブリダイゼーション反応を行うことができる。それで、RNAの高次構造の前記悪影響は、前処理としての加熱変性処理、ヘルパープローブの併用だけで克服可能である。これにより本発明方法においてハイブリダイゼーション効率は実質的に100%になり、定量性が向上する。また、従来方法に較べて格段に簡便になる。

【0029】本発明のプローブの塩基数は5~60であり、好ましくは10~35、特に好ましくは15~20である。60を超える場合は、FISH方法に用いたとき細胞膜の透過性が悪くなり、本発明の適用範囲を狭めることになる。5未満の場合は、非特異的ハイブリダイゼーションが惹起し易くなり、測定誤差が大きくなる。

【0030】その構造は、核酸プローブが、その末端部においてドナー色素で標識されており、当該核酸プローブが当該末端部において標的核酸にハイブリダイズしたとき、当該プローブにハイブリダイズした標的核酸の末端塩基から1ないし3塩基離れて、標的核酸の塩基配列にC（シトシン）またはG（グアニン）が少なくとも1塩基存在するように、当該プローブの塩基配列が設計されていることである。

【0031】好ましくは、核酸プローブが、標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、ドナー色素標識部においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのG（グアニン）とC（シトシン）のペアを形成するように、当該プローブの塩基配列が設計されていることである。より好ましくは、ドナー色素標識部位はG（グアニン）またはC（シトシン）塩基か、またはその塩基を有するヌクレオチドのリン酸基、またはリボースのOH基である。

【0032】ドナー色素およびアクセプター色素の標識部位は、ドナー色素が核酸プローブの5'末端部において、塩基、リン酸部またはリボース部を標識しているときに、アクセプター色素が核酸プローブの鎖中もしくは3'末端部（3'末端塩基を含む。）である。また、ドナー色素が核酸プローブの3'末端部において、塩基、リン酸部またはリボース部を標識しているときに、アクセプター色素が核酸プローブの鎖中もしくは5'末端部（3'末端塩基を含む。）である。末端部を標識する場合には、両者の色素で、標識してもよい。すなわち、例えば、両者の一方で、リン酸部を標識し、他方でリボース部、または塩基部を標識してもよい（例えばドナー色素とアクセプター色素の標識部塩基間距離が0の場合（下記に記述した。）。）。また、側鎖を有するスペーサーを用いて、一本のスペーサーに両者を結合させてもよい。本発明においてはドナー色素、アクセプター色素共に鎖中を標識しておいても前記の条件さえ満たせばよいことは勿論である。前記各部位における蛍光色素の結合位置は、OH基、またはアミノ基にスペーサーを介して結合させるのが好適である。

【0033】ドナー色素とアクセプター色素の標識部塩基間距離は、本質的にはドナー色素とアクセプター色素の色素ペアの種類に依存するが、一般的には0~50塩基、好ましくは0~40塩基、より好ましくは0~35塩基、特に好ましくは0~15塩基である。50塩基を越えると、FRET現象が不安定になる。15~50塩基では、アクセプター色素の蛍光強度は減少するが、ドナー色素の蛍光強度は増加する場合がある。すなわち、核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズしたとき、核酸プローブの立体構造が変化する場合がある。そしてその変化により核酸プローブの色素間のFRET現象が解消する場合が出てくる。ドナー色素に対するアクセプター色素のクエンチング作用（消光作用）とドナー色素に対するGCの水素結合体の当該作用の大小に依存して、ドナー色素の蛍光強度がハイブリダイゼーション前より増加したり、減少したりする。GCの水素結合体のクエンチング作用の方が大きいときは減少するが、小さいときは増加する。15塩基未満の場合は、ハイブリダイゼーション後において、ドナー色素およびアクセプター色素の蛍光強度は共に減少する。そして減少量はハイブリダイゼーション後の核酸プローブの立体構造に依存しなくな



り、測定反応系の標的核酸の濃度だけに依存するようになる。ハイブリダイゼーション後において、ドナー色素およびアクセプター色素の蛍光強度は共に減少させる場合、特に好ましい塩基数は0～10塩基である。

【0034】それで、本発明のプロープの特に好ましい形態は、ドナー色素とアクセプター色素の前記標識部塩基間距離を有し、ドナー色素がBODIPY FL、BODIPY 493/503、5-FAM、Tetramethylrhodamine、または6-TAMRAで、またアクセプター色素がBODIPY 581/591、X-ローダミンで、5'末端塩基がGまたはCで、かつ5'末端がドナー色素で標識されているものか、または、核酸プローブの3'末端塩基がGまたはCで、かつ3'末端がドナー色素で標識されているものである。

【0035】本発明の核酸測定用の新規な核酸プローブの構造は上記の通りである。このような構造になっていると、励起されたドナー色素のエネルギーは標的核酸にハイブリダイズしていないときは、アクセプター色素に転移するので、アクセプター色素が発光して、蛍光強度を有している。それで、ドナー色素も発光が抑制されているので、蛍光強度も低いレベルに保たれている。ところが、核酸プローブが標的核酸にハイブリダイズすると、ドナー色素のエネルギーはプローブ-核酸ハイブリッド複合体により生ずるGCの水素結合体の方に転移する。また、核酸プローブの立体構造が変化してFRET現象が解消する場合も出てくる。それで、アクセプター色素の発光が減少する。

【0036】本発明の核酸プローブのオリゴヌクレオチドは、通常の一般的オリゴヌクレオチドの製造方法で製造できる。例えば、化学合成法、プラスミドベクター、ファージベクター等を使用する微生物法等で製造できる(Tetrahedron letters、22巻、1859～1862頁、1981年; Nucleic acids Research、14巻、6227～6245頁、1986年)。尚、現在、市販されている核酸合成機を使用するのが好適である(例えば、ABI394(Perkin Elmer社製、USA))。

【0037】オリゴヌクレオチドに蛍光色素を標識するには、従来公知の標識法のうちの所望のものを利用することができる(Nature Biotechnology、14巻、303～308頁、1996年; Applied and Environmental Microbiology、63巻、1143～1147頁、1997年; Nucleic acids Research、24巻、4532～4535頁、1996年)。例えば、5'末端に蛍光色素分子を結合させる場合は、先ず、常法に従って5'末端のリン酸基にスペーサーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-SH$ を導入する。これらの導入体は市販されているので市販品を購入してもよい(メドランド・サーティファイド・レージント・カンパニー(Midland Certified Reagent Company))。この場合、nは3～8、好ましくは6である。このスペーサーにSH基反応性を有する蛍光色素またはその誘導体を結合させることにより標識したオリゴヌクレオチドを合成できる。

このようにして合成された蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドは、逆相等のクロマトグラフィー等で精製して本発明の核酸プローブとすることができる。

【0038】また、オリゴヌクレオチドの3'末端塩基も標識できる。この場合は、リボースまたはデオキシリボースの3'位CのOH基にスペーサーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-NH_2$ を導入する。これらの導入体も前記と同様にして市販されているので市販品を購入してもよい(メドランド・サーティファイド・レージント・カンパニー(Midland Certified Reagent Company))。また、リン酸基を導入して、リン酸基のOH基にスペーサーとして、例えば、 $-(CH_2)_n-SH$ を導入する。これらの場合、nは3～8、好ましくは4～7である。このスペーサーにアミノ基、SH基に反応性を有する蛍光色素またはその誘導体を結合させることにより標識したオリゴヌクレオチドを合成できる。

【0039】また、オリゴヌクレオチドの鎖中塩基も標識できる。塩基のアミノ基またはOH基を5'または3'末端の方法と同様にして本発明の色素で標識すればよい(ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 225、32-38頁(1998年))。アミノ基を導入する場合、キット試薬(例えば、Uni-link aminomodifier(CLONTECH社製、米国)、フルオ・リポターキット(FluoReporter Kit) F-6082、F-6083、F-6084、F-10220(いずれもモレキュラー・プローブ(Molecular Probes)社製、米国))を用いるのが便利である。そして、常法に従って当該オリゴヌクレオチドに蛍光色素分子を結合させることができる。このようにして合成されたオリゴヌクレオチドは、逆相等のクロマトグラフィー等で精製して本発明の核酸プローブとすることができる。

【0040】以上のようにして、本発明の核酸プローブは作製できる。作製された本発明の核酸測定用核酸プローブは、標的核酸にハイブリダイズしたときに、プローブ-核酸ハイブリッド複合体の発光の蛍光強度が、複合体を形成する前に較べて著しく減少する。そして、一種類のドナー色素に複数のアクセプター色素の組み合わせができるので、その組み合わせの数の核酸プローブができる。しかも前記性質を有している。実際の核酸測定においては、アクセプター色素の蛍光強度の減少を測定することになるので、一つの励起波長で多種類の核酸プローブを同時に使用できることになる。そのことは、同一測定系内に多種類の標的核酸が存在する場合に、このような核酸プローブを同時に添加すれば、一つの励起波長で多種類の核酸を同時に測定できることになる。すなわち、単純な装置で多種類の核酸を同時に測定できることになる。

【0041】本発明の第2発明は、上記のようにして作製された核酸プローブを使用して、標的核酸を測定する方法である。すなわち、少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系に、本発明の前記1～10の少なくとも

もいずれかに記載の核酸測定用核酸プローブであって、当該標的核酸にハイブリダイズする核酸測定用の核酸プローブで、かつ標的核酸の種の数と少なくとも同数の種の数でかつ発光蛍光色の異なる核酸測定用プローブを存在させ、核酸測定用プローブと標的核酸をハイブリダイズさせて、核酸測定用プローブの種の数と少なくとも同数の種の数で、ハイブリダイゼーション前後における測定波長の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とする核酸測定方法である。また、その測定キット、その測定のためのデータ解析方法、その測定装置、およびデータ解析過程をコンピュータに実行させるための手順をプログラムとして記録したコンピュータ読取可能な記録媒体である。

【0042】本発明において、前記の「少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系」とは、単数種または複数種の標的核酸が測定系に存在するという意味である。また、「本発明の前記1～10の少なくともいずれかに記載の核酸測定用核酸プローブ」とは、次のような意味である。本発明において、測定系に単数種の標的核酸が存在する場合に、測定系に存在させる核酸測定用核酸プローブの種は単数種でも複数種でもよい。この「複数でもよい」とは、一種の標的核酸に塩基配列の異なった複数部位にハイブリダイズする複数の種の核酸測定用核酸プローブを使用してもよいという意味である。

【0043】本発明において、複数種の標的核酸が存在する場合は、少なくとも複数種の核酸測定用核酸プローブを存在させることを特徴としている。そしてその種類の数は標的核酸種と少なくとも同数である。そして、この「少なくとも同数」とは、一種の標的核酸に、複数種の核酸測定用プローブがハイブリダイズする塩基配列部位を設定して、一種の標的核酸に対して複数種の核酸測定用プローブを測定系に存在させてもよいという意味である。また、前記単数種および複数種の標的核酸が測定系に存在する場合における「複数種の核酸測定用プローブ」とは、次のような意味である。すなわち、(1)本発明の前記1～10のいずれかに記載の核酸測定用核酸プローブの中の種類の異なった複数のプローブである。例えば、プローブの形態若しくは構造は同じであるが、互いに標識する色素が単に異なったプローブを例に挙げることができる。(2)プローブの形態若しくは構造が異なった核酸測定用プローブの組合せであるが、互いに標識色素が異なった複数種の核酸測定用プローブである。すなわち、前記1～10の各項にまたがった核酸プローブでもよいという意味である。例えば前記5に記載のプローブの種類の中の一つのプローブ、前記6に記載のプローブの種類の中の一つのプローブと前記10に記載のプローブの種類の中の一つのプローブの組合せで、互いに標識色素が異なった複数種の核酸測定用プローブなどのこと(なお、この例示により本発明は何ら限定されるものではない。)。前記の定義は以下の記

載事項においても同様であるものとする。

【0044】本発明の第3発明は、少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系における標的核酸の多型(polymorphism)または/および変異(mutation)を解析もしくは測定する方法において、前記1～10の少なくともいずれかに記載の核酸プローブであって、標的核酸の種の数と少なくとも同数の種の数で、かつ発光蛍光色の異なる核酸測定用プローブを測定系に存在させ、標的核酸と核酸測定用プローブをハイブリダイズさせて、核酸測定用プローブの種の数と少なくとも同数の種の数で、ハイブリダイゼーション前後における測定波長の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とする標的核酸の多型または/および変異を解析もしくは測定する方法、その測定キット、その測定のためのデータ解析方法、その測定装置、およびデータ解析過程をコンピュータに実行させるための手順をプログラムとして記録したコンピュータ読取可能な記録媒体である。

【0045】すなわち、本発明の核酸プローブは、単に核酸測定だけでなく、標的核酸の多型(polymorphism)または/および変異(mutation)を解析もしくは測定する方法に好適に利用できる。特に下記に述べるDNAチップ(蛋白質 核酸 酵素、43巻、2004～2011ページ、1998年)と併用することにより便利な方法を提供する。すなわち、本発明の核酸プローブとのハイブリダイゼーションにおいて、GCペアを形成するかどうかにより、蛍光強度が変化する。それで、本発明の核酸プローブを標的核酸にハイブリダイズさせ、発光強度を測定することにより、標的核酸の多型(polymorphism)または/および変異(mutation)を解析もしくは測定することができる。具体的方法は、実施例に記した。この場合、標的核酸は各種の核酸増幅方法のうちの一つの方法により増幅された増幅物でもよいし、抽出されたものでもよい。また標的核酸はその種類を問わない。ただ、鎖中または末端にグアニン塩基またはシトシン塩基が存在しておればよい。鎖中または末端にグアニン塩基またはシトシン塩基が存在しないと蛍光強度が減少しない。よって、本発明方法により、 $G \rightarrow A$ 、 $G \leftarrow A$ 、 $C \rightarrow T$ 、 $C \leftarrow T$ 、 $G \rightarrow C$ 、 $G \leftarrow C$ の変異、または置換、すなわち、1塩基多型(single nucleotide polymorphism (SNP))などの多型(polymorphism)等を解析もしくは測定することができる。なお、現在、多型分析は、マキサム・ギルバート(Maxam-Gilbert)法、ジデオキシ(dideoxy)法を用いて標的核酸の塩基配列を決定することにより行われているのが現状である。

【0046】それで、本発明の核酸プローブを標的核酸の多型(polymorphism)および変異(mutation)を解析もしくは測定する測定キットに含有させることにより、標的核酸の多型(polymorphism)または/および変異(mutation)を解析もしくは測定する測定キットとして好適に使用することができる。

【0047】本発明の標的核酸の多型 (polymorphism) または／および変異 (mutation) を解析もしくは測定する方法により得られるデータを解析する場合に、標的核酸が本発明の核酸プローブとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光強度値を、前記のものがハイブリダイズしていないときの反応系の蛍光強度値により補正する処理過程を設けると、処理されたデータは信頼性の高いものになる。それで第3発明は、標的核酸の多型 (polymorphism) または／および変異 (mutation) を解析もしくは測定する方法のためのデータ解析方法を提供する。

【0048】また、第3発明は、標的核酸の多型 (polymorphism) または／および変異 (mutation) を解析もしくは測定する測定装置において、標的核酸が本発明の核酸プローブとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光強度値を、前記のものがハイブリダイズしていないときの反応系の蛍光強度値により補正処理する手段を有することを特徴とする標的核酸の多型 (polymorphism) または／および変異 (mutation) を解析もしくは測定する測定装置である。

【0049】また、第3発明は、標的核酸の多型 (polymorphism) または／および変異 (mutation) を解析もしくは測定する方法により得られるデータを解析する場合に、標的核酸が本発明の核酸プローブとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光強度値を、前記のものがハイブリダイズしていないときの反応系の蛍光強度値により補正する処理過程をコンピュータに実行させるための手順をプログラムとして記録したコンピュータ読取可能な記録媒体である。

【0050】また、第3発明は、本発明の核酸測定用核酸プローブを複数個固体支持体表面に結合させ、それに標的核酸をハイブリダイズさせて標的核酸を測定することができるようにしたことを特徴とする複数の核酸の濃度をそれぞれ測定するためのデバイス、そのデバイスにおいて、核酸プローブが固体支持体表面にアレー状に配列、結合させた複数核酸をそれぞれ測定するためのデバイス (チップ) であり、また、固体支持体表面に結合させられた核酸プローブ毎に、反対側の表面に少なくとも一つの温度センサーとヒーターが設置され、核酸プローブ結合領域が最適温度条件になるように温度調節され得るデバイスである。

【0051】すなわち、本発明の核酸プローブは固体 (支持層) 表面、例えばスライドガラスの表面に固定することができる。この形式は現在DNAチップと言われる。遺伝子発現 (gene expression) のモニタリング、塩基配列 (base sequence) の決定、変異解析 (mutation analysis)、1塩基多型 (single nucleotide polymorphism (SNP)) などの多型解析 (polymorphism analysis) 等に使用できる。勿論、核酸測定用デバイス (チップ) として使用することもできる。

【0052】本発明の核酸プローブを例えばスライドガ

ラスの表面に結合させるには、ポリリジン、ポリエチレンイミン、ポリアルキルアミンなどのポリ陽イオンをコートしたスライドガラス、アルデヒド基を導入したスライドガラス、アミノ基を導入したスライドガラスを先ず用意する。そして、i) ポリ陽イオンをコートしたスライドガラスには、プローブのリン酸基を反応させる、ii) アルデヒド基を導入したスライドガラスには、アミノ基を導入したプローブを反応させる、iii) アミノ基を導入したスライドガラスには、PDC (pyridinium dichromate) 導入、アミノ基またはアルデヒド基を導入したプローブを反応させる、などにより達成できる (Fodor, P. A., et al., Science, 251, 767-773 (1991); Schena, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 93, 10614-10619 (1996); McGil, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 93, 13555-13560 (1996); Blanchard, A. P., et al., Biosens. Bioelectron., 11, 687-690 (1996))。

【0053】本発明の核酸測定用核酸プローブを固体表面にアレー状に配列、結合させたデバイスは核酸測定がより便利になる。この場合、塩基配列の異なる多くの本発明の核酸プローブを、個別に同一固体表面上に結合しているデバイスをつくることにより、同時に多種類の標的核酸を測定できる。このデバイスにおいては、プローブ毎に、前記固体の本発明の核酸プローブを結合した面と反対側の面に少なくとも一つの温度センサーとヒーターを設け、そのプローブを結合した前記固体の領域が最適温度条件になるように温度調節され得るように設計されているのが特に好適である。

【0054】本発明のデバイスを用いる測定方法の基本的操作は、核酸プローブを結合した固体表面上に標的核酸を含む溶液をのせ、ハイブリダイズさせるだけである。これにより、標的核酸量に応じて蛍光量の変化がおこり、その蛍光変化量から標的核酸の測定が可能となる。また、一つの固体表面上に塩基配列の異なる本発明の核酸プローブを多数種結合させることにより、一度に多くの標的核酸の濃度を測定することができる。それで、DNAチップと全く同じ用途で標的核酸の測定に使用できるので新規のDNAチップである。最適の反応条件では標的核酸以外の核酸は蛍光の発光量を変化させないために、未反応な核酸を洗浄する操作は必要がない。更に、微小ヒーターにて本発明の核酸プローブ毎に温度コントロールすることにより、当該プローブ毎に最適反応条件にコントロールできるために正確な濃度の測定が可能となる。また、微小ヒーターにて温度を連続的に変化させ、その間、蛍光量を測定することにより、本発明の核酸プローブと標的核酸との解離曲線を解析することができる。その解離曲線の違いからハイブリダイズした核酸の性質の判定や、SNPの検出ができる。

【0055】従来の標的核酸の濃度測定用デバイスは、蛍光色素で修飾されていない核酸プローブを固体表面に結合 (固定: fix) し、それに蛍光色素で標識した標的

核酸をハイブリダイズさせた後、ハイブリダイズしていない標的核酸を洗い流して、残存している蛍光色素の蛍光強度を測定していた。蛍光色素で標的核酸を標識するには、例えば、特定mRNAを標的とした場合、次のステップ (steps) を取る：(1) 細胞から抽出されたmRNA全部を抽出する。(2) それから、逆転写酵素 (reverse transcriptase) を用いて、蛍光色素で修飾されヌクレオサイドをとり込ませながらcDNAを合成する。本発明ではこのような操作は必要がない。

【0056】当該デバイスには各種のプロープが多数スポットしてあるが、その各々のプロープにハイブリダイズする核酸の最適ハイブリダイゼーション条件、例えば、温度等は各々異なる。よって本来であれば、プロープ毎 (スポット毎) に、ハイブリダイゼーション反応、洗浄操作を最適な条件で行う必要がある。しかし、それは物理的に不可能であるので、すべてのプロープ毎に同一の温度でハイブリダイゼーションを行い、また、洗浄も同一温度で同一洗浄液で行われている。それで、ハイブリダイゼーションが期待されている核酸がハイブリダイズしなかったり、ハイブリダイズしてもハイブリダイゼーションが強固でないで容易に洗い流されてしまう等の欠点を有していた。そのような原因で核酸の定量性が低いものであった。本発明ではこの洗浄操作が必要ないのでこのような欠点を有しない。また、スポットの底に微小ヒータを設け、ハイブリダイゼーション温度をコントロールすることで、本発明のプロープ毎に最適温度でハイブリダイゼーション反応を行わせることができる。それで、本発明は定量性が格段に向上したものである。

【0057】本発明においては、前記した本発明の核酸測定用の核酸プロープまたはデバイスを使用することで、少なくとも一種以上の標的核酸が存在する測定系において、標的核酸を短時間で、簡便かつ特異的に測定することができる。以下に測定法を述べる。本発明の測定方法において、まず、測定系に本発明の核酸測定用の標的核酸に対応する核酸プロープを標的核酸の種の数と少なくとも同数の種の数だけ添加し、標的核酸にハイブリダイズさせる。その方法は、通常の既知方法で行なうことができる (Analytical Biochemistry、183巻、231～244頁、1989年; Nature Biotechnology、14巻、303～308頁、1996年; Applied and Environmental Microbiology、63巻、1143-1147頁、1997年)。例えば、ハイブリダイゼーションの条件は、塩濃度が0～2モル濃度、好ましくは0.1～1.0モル濃度、pHは6～8、好ましくは6.5～7.5である。

【0058】反応温度は、本発明の核酸測定用の核酸プロープが標的核酸の特異的部位にハイブリダイズして得られる核酸ハイブリッド複合体のTm値±10℃の範囲内であるのが好ましい。このようにすることにより非特異的なハイブリダイゼーションを防止することができ

る。Tm-10℃未満のときは、非特異的なハイブリダイゼーションが起こり、Tm+10℃を越えるときは、ハイブリダイゼーションが起こらない。尚、Tm値は本発明の核酸測定用の核酸プロープを設計するのに必要な実験と同様に求めることができる。すなわち、本発明の核酸測定用の核酸プロープとハイブリダイズする (当該核酸プロープに対して相補する塩基配列の) オリゴヌクレオチドを前記の核酸合成機等で化学合成し、当該核酸プロープとの核酸ハイブリッド複合体のTm値を通常の方法で測定する。測定系に複数の標的核酸が存在するときは複数の核酸ハイブリッド複合体の平均値を採用してもよいし、最も重要視している標的核酸のものを採用してもよい。

【0059】また、その反応時間は1秒間～180分間、好ましくは5秒間～90分間である。1秒間未満のときは、ハイブリダイゼーションにおいて未反応の本発明の核酸プロープが多くなる。また、反応時間を余り長くしても特に意味がない。なお、反応時間は核酸種、すなわち、核酸の長さ、あるいは塩基配列によって大きく影響を受ける。前記のようにして、本発明の核酸測定用の核酸プロープを標的核酸にハイブリダイズさせる。そして、ハイブリダイゼーションの前後で、ハイブリダイゼーション反応系の蛍光強度を、添加した核酸測定用プロープの種の数と少なくとも同数の種の数で波長で蛍光光度計で測定し、各波長におけるその減少量を計算する。その減少量の大きさは標的核酸の濃度と比例するので、標的核酸の濃度を求めることができる。

【0060】反応液中の標的核酸の濃度：0.1～10.0nMであるのが好ましい。反応液中の本発明の核酸プロープの濃度：1.0～25.0nMであるのが好ましい。検量線を作成する場合は、標的核酸に対して、本発明の核酸プロープを1.0～2.5の比率で用いるのが望ましい。

【0061】実際、試料中の未知濃度の標的核酸を測定する場合、上記の条件でまず、検量線を作成する。標的核酸が複数の場合は、標的核酸に対応した本発明の各核酸プロープの各測定波長について検量線を作成する。そして、複数の濃度に対応する本発明の核酸プロープを試料に添加して、それぞれ蛍光強度値の減少を測定する。そして、測定された蛍光強度の減少値のうちの最大なものに対応するプロープ濃度を好ましいプロープ濃度とする。好ましい濃度のプロープで測定された蛍光強度の減少値をもって、検量線から標的核酸の定量値を求めることになる。

【0062】本発明の第4発明は、本発明は各種の核酸測定方法、例えば、FISH方法、PCR方法、LCR方法、SD方法、競合的ハイブリダイゼーション方法、TAS方法、などに適用する発明である。

【0063】以下にその例を記す。

a) FISH方法に適用した場合

即ち、本発明は色々の種類の微生物が混在するか、もしくは一種類以上の微生物が動物や植物由来の細胞と共に混在していて、相互に単離できない微生物系（複合微生物系、共生微生物系）の細胞内もしくは細胞のホモジネート等の核酸測定に好適に適用できる。ここでいう微生物とは一般的にいう微生物のことで、特に限定されるものではない。例えば、真核微生物、原核微生物、その他、マイコプラズマ、ウイルス、リッケチャ等を挙げることができる。そして、この系でいう標的核酸とは、これらの微生物系において、例えば、どのように活躍しているのか調べたい菌株の細胞に特異性を有する塩基配列をもつ核酸のことである。例えば、特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはそれらの遺伝子DNAの特定配列である。

【0064】本発明の核酸プローブを複合微生物系または共生微生物系に添加し、特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはそれらの遺伝子DNAの量を測定することにより、当該系における特定菌株の存在量を測定することができる。尚、複合微生物系または共生微生物系のホモジネートに前記核酸プローブを添加して、ハイブリダイゼーション前後における蛍光色素の発光の減少量を測定して特定菌株の存在量を測定する方法も、本発明の技術的範囲内とする。

【0065】前記の測定方法は、例えば、以下の如くである。即ち、本発明の核酸プローブを添加する前に、複合微生物系または共生微生物系の温度、塩濃度、pHを前記の条件に調整する。複合微生物系または共生微生物系における特定菌株は、細胞数として $10^7 \sim 10^{12}$ 個/ml、好ましくは $10^9 \sim 10^{10}$ 個/mlに調整することが好適である。それは希釈、または遠心分離等による濃縮等で行うことができる。細胞数が $10^7$ 個/ml未満のときは、蛍光強度が弱く、測定誤差が大きくなる。 $10^{12}$ 個/mlを超えるときは、複合微生物系または共生微生物系の蛍光強度が強すぎるため、特定微生物の存在量を定量的に測定することができなくなる。

【0066】添加する本発明の核酸プローブの濃度は、複合微生物系または共生微生物系における特定菌株の細胞数に依存する。細胞数 $1 \times 10^8$ /mlに対して、 $1 \sim 10$ 、 $0 \text{ nM}$ 濃度、好ましくは $0.5 \sim 5 \text{ nM}$ 濃度、より好ましくは $1.0 \text{ nM}$ 濃度である。 $0.1 \text{ nM}$ 未満のときは、特定微生物の存在量を正確に反映したデータにならない。しかし、最適な本発明の核酸プローブの量は、細胞内の標的核酸量に依存するために一概にはいえない。

【0067】次に本発明において前記核酸プローブと特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはその遺伝子DNAにハイブリダイズさせるときの反応温度は、前記した条件と同様である。また、その反応時間も前記の条件と同様である。前記のような条件で本発明の核酸プローブを特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはその

遺伝子DNAにハイブリダイズさせ、ハイブリダイゼーション前後の複合微生物系または共生微生物系の蛍光色素の発光の減少量を測定する。

【0068】前記のようにして測定された蛍光色素の発光の減少量は、複合微生物系または共生微生物系における特定菌株の存在量と比例する。それは5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはそれらの遺伝子DNAの量と特定菌株の存在量とが比例するからである。

【0069】なお、本発明において、複合微生物系または共生微生物系における微生物以外の成分は、本発明の核酸プローブと特定菌株の5SrRNA、16SrRNAもしくは23SrRNAまたはそれらの遺伝子DNAとのハイブリダイゼーションを阻害しない限り、また、本発明の核酸プローブの蛍光色素の発光を阻害をしない限り、特に限定されない。例えば、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 等のリン酸塩、硫酸、硝酸、尿素等の無機窒素類、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、カルシウムイオン等の金属イオンの各種塩類、マンガン、亜鉛、鉄、コバルトイオン等の微量金属イオンの硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩等の各種塩類、更にビタミン類等が適当に含まれていてもよい。もし、上記の阻害が観察される場合は、遠心分離等の操作で複数の微生物が混在する細胞系から細胞を分離し、再び緩衝液系等に懸濁すればよい。

【0070】上記の緩衝液としては、リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス・塩酸緩衝液、トリス・グリシン緩衝液、クエン酸緩衝液、グット緩衝液等の各種緩衝液をも用いることができる。緩衝液の濃度は、ハイブリダイゼーション、FRET現象、蛍光色素の発光を阻害しない濃度である。その濃度は緩衝液の種類に依存する。緩衝液のpHは $4 \sim 12$ 、好ましくは $5 \sim 9$ である。

【0071】b) PCR方法に適用する場合  
PCR方法であればどのような方法でも適用できるのであるが、リアルタイム定量的PCR方法に適用する場合を以下に記す。即ち、リアルタイム定量的PCR方法において、本発明の核酸測定用の核酸プローブを用いてPCRを行い、反応前後の反応系の蛍光強度の減少をリアルタイムで測定するものである。本発明のPCRとは各種方法のPCRを意味するものである。例えば、RT-PCR、RNA-primed PCR、Stretch PCR、逆PCR、Alu配列を利用したPCR、多重PCR、混合プライマーを用いたPCR、PNAを用いたPCR法等をも含む。また、定量的とは、本来の定量測定の他に、検出程度の定量測定をも意味するのは前記同様である。

【0072】前記のとおり、標的核酸とは、存在量を測定する核酸のことを云う。精製の有無を問わない。また、濃度の大小も問わない。各種の核酸が混在してい



もよい。例えば、複合微生物系（複数微生物のRNAもしくは遺伝子DNAの混在系）または共生微生物系（複数の動植物および／または複数微生物のRNAもしくは遺伝子DNAの混在系）における増幅目的の特定核酸である。尚、標的核酸の精製が必要な場合は従来公知の方法で行うことができる。例えば、市販されている精製キット等を使用して行うことができる。

【0073】従来公知の定量的PCR方法はdATP、dGTP、dCTP、dTTPもしくはdUTP、標的核酸（DNAまたはRNA）、Taqポリメラーゼ、プライマー、ならびに蛍光色素で標識した核酸プローブもしくはインターカレーターを用いてMgイオンの存在下に、温度を低温、高温を繰り返しつつ標的核酸を増幅し、増幅過程の蛍光色素の発光の増加量をリアルタイムでモニタリングするものである（実験医学、15巻、7号、46～51ページ、1997年、羊土社）。

【0074】本発明の定量的PCR方法は、少なくとも一種以上の標的核酸を増幅させるに当たり、標的核酸の種の数と、少なくとも同数の種の数の本発明の核酸プローブを用いて標的核酸を増幅させ、増幅過程において、核酸プローブの種の数と少なくとも同数の種の数の波長で反応系の蛍光強度の減少量を測定することを特徴とするものである。本発明の定量的PCRにおいて、本発明の核酸測定用の核酸プローブは、どれでも好適に利用できるが、その塩基数は5～50であり、好ましくは10～25、特に好ましくは15～20で、PCRサイクル中に標的核酸の増幅産物とハイブリダイズするものであれば、どのようなものでもよい。また、フォワード（forward）型、リバース（reverse）型のどちらに設計してもよい。

【0075】そして、好ましい核酸プローブとしては、以下のものを挙げることができる。

（1）核酸プローブが、標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、ドナー色素標識部においてプローブ核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのG（グアニン）とC（シトシン）のペアーを形成するように、当該プローブの塩基配列が設計されていることである。より好ましくは、

（2）前記（1）のうち、ドナー色素標識部位はG（グアニン）またはC（シトシン）塩基か、またはその塩基を有するヌクレオチドのリン酸基、またはリボースのOH基である。そして、アクセプター色素は3'末端塩基を含まない3'末端部もしくは鎖中である。

（3）前記（2）のうち、アクセプター色素は鎖中でも、ドナー色素標識部位に近い方に標識されている核酸プローブである。

【0076】本発明の核酸プローブのうち、（1）ドナー色素が核酸プローブの5'末端部塩基もしくは5'末端塩基を標識しているときに、アクセプター色素が核酸プローブの鎖中もしくは3'末端部の塩基を標識してい

る核酸プローブはプライマーとして利用できるようにしてあるものである。

【0077】このプライマーとして利用するとき、標的核酸の塩基配列から、どうしても3'もしくは5'末端がGまたはCに設計できない場合は、標的核酸の塩基配列から設計したプライマーであるオリゴヌクレオチドの5'末端に、5'-グアニル酸もしくはグアノシンまたは5'-シチジル酸もしくはシチジンを付加しても、本発明の目的は好適に達成できる。3'末端に5'-グアニル酸または5'-シチジル酸を付加しても、本発明の目的は好適に達成できる。よって、本発明において、3'または5'末端の塩基がGまたはCになるように設計した核酸プローブとは、標的核酸の塩基配列から設計したプローブの他に、当該のプローブの5'末端に5'-グアニル酸もしくはグアノシンまたは5'-シチジル酸もしくはシチジンを付加してなるプローブ、ならびに当該のプローブの5'末端に5'-グアニル酸または5'-シチジル酸を付加してなるプローブを含むものと定義する。

【0078】また、本発明の核酸プローブのうち、（2）ドナー色素が核酸プローブの3'末端部塩基（3'末端塩基を含む。）または3'末端のリボース若しくはデオキシリボースを標識しているときに、アクセプター色素が核酸プローブの鎖中もしくは5'末端部の塩基を標識している核酸プローブはプライマーとして利用されないように設計したものである。FRET現象を用いるリアルタイム定量的PCR方法において使用する（蛍光色素で標識した）二つのプローブの代わりに、一つの本発明の核酸プローブを用いてPCRを行うものである。PCRの反応系に当該プローブを添加し、PCRを行う。核酸伸長反応時、標的核酸もしくは増幅標的核酸にハイブリダイズしていた当該プローブがポリメラーゼにより分解され、核酸ハイブリッド複合体から分解除去される。このときの反応系または核酸変性反応が完了した反応系の蛍光強度値を測定する。また、標的核酸もしくは増幅した増幅標的核酸が当該プローブとハイブリダイズしている反応系（アニーリング反応、もしくはポリメラーゼにより当該プローブが核酸ハイブリッド複合体から除かれるまでの核酸伸長反応時の反応系）の蛍光強度値を測定する。そして、前者からの蛍光強度値の減少率を算出することにより増幅された核酸を測定する。当該プローブが標的核酸もしくは増幅標的核酸から、核酸変性反応により完全に解離するか、または核酸伸長時にポリメラーゼにより当該プローブと標的核酸もしくは増幅標的核酸との核酸ハイブリッド複合体から分解除去されたときは蛍光強度値は大きい。しかし、当該プローブが標的核酸もしくは増幅標的核酸に十分にハイブリダイズしているアニーリング反応が完了している反応系もしくは核酸伸長反応時にポリメラーゼにより当該プローブと標的核酸もしくは増幅標的核酸との核酸ハイブリッド



複合体から分解除去されるまでの反応系の蛍光強度値は前者より減少している。蛍光強度値の減少は増幅された核酸量に比例する。

【0079】この場合、当該プローブが標的核酸とハイブリダイズしたときのその核酸ハイブリッド複合体の $T_m$ が、プライマーの核酸ハイブリッド複合体の $T_m$ 値の $\pm 15^\circ\text{C}$ 、好ましくは $\pm 5^\circ\text{C}$ の範囲になるように、

(2)のプローブの塩基配列が設計されることが望ましい。プローブの $T_m$ 値が、プライマーの $T_m$ 値 $-5^\circ\text{C}$ 、特に $-15^\circ\text{C}$ 未満であると、プローブがハイブリダイズしないために、蛍光色素の発光の減少は起こらない。反対にプライマーの $T_m$ 値 $+5^\circ\text{C}$ 、特に $+15^\circ\text{C}$ を超えると、プローブが標的核酸以外の核酸ともハイブリダイズするので、プローブの特異性が失われる。

【0080】上記(2)以外のプローブ、特に(1)のプローブは、プライマーとしてPCRの反応系に添加するものである。蛍光色素で標識されたプライマーを用いるPCR方法は本発明以外未だ知られていない。PCRの反応が進むに従い、増幅された核酸は本発明の実施に有用な蛍光色素で2次標識される。それで、核酸変性反応が完了している反応系の蛍光強度値は大きい、アニーリング反応が完了しているかもしくは核酸伸長反応時の反応系においては、反応系の蛍光強度は前者の蛍光強度より減少する。

【0081】PCRの反応は通常のPCR方法と同様の反応条件で行うことができる。それで、 $\text{Mg}$ イオン濃度が低濃度(1~2mM)である反応系で標的核酸の増幅を行うことができる。勿論、従来公知の定量的PCRにおいて使用されている高濃度(2~4mM)の $\text{Mg}$ イオン存在下の反応系でも本発明は実施できる。

【0082】尚、本発明のPCR方法において、本発明のPCRを行い、使用した本発明プローブの種の数と少なくとも同数の種の数の波長でその増幅産物について核酸の融解曲線を分析を行って標的核酸の $T_m$ 値を求めることができる。この方法は新規な核酸の融解曲線の分析方法である。本方法において本発明のPCR方法に用いた核酸プローブまたはプライマーとして用いた本発明の核酸プローブが好適に利用できる。この場合、本発明の核酸プローブの塩基配列を、SNP(スニップ;一塩基置換多型)を含む領域と相補的な配列にすることで、PCR終了後、その核酸の本発明の核酸プローブから解離曲線を解析することにより、その解離曲線の違いからSNPの検出ができる。本発明の核酸プローブの配列としてSNPを含む配列と相補的な塩基配列を使用すれば、プローブ配列とSNPを含む配列との解離曲線より得られる $T_m$ 値は、SNPを含まない配列との解離曲線から得られる $T_m$ 値より高くなる。

【0083】本発明の第5発明は、前記のリアルタイム定量的PCR方法ので得られるデータを解析する方法の発明である。リアルタイム定量的PCR方法は、現在、

PCRを行わせる反応装置、蛍光色素の発光を検出する装置、ユーザーインターフェース、即ち、データ解析方法の各手順をプログラム化して、それを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体(別称:Sequence Detection Software System)、およびそれらを制御し、データ解析するコンピュータから構成される装置で、リアルタイムで測定されている。それで、本発明の測定もこのような装置で行われる。

【0084】以下に、先ず、リアルタイム定量的PCRの解析装置から説明する。本発明において用いる装置は、PCRをリアルタイムでモニタリングできる装置であればどのような装置でもよいが、例えば、ABI PRISM<sup>TM</sup> 7700 塩基配列検出システム(Sequence Detection System SDS 7700)(パーキン・エルマー・アプライド・バイオシステム社(Perkin Elmer Applied Biosystems社、USA))、ライトサイクラー<sup>TM</sup> システム(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社、ドイツ)等を特に好適なものとして挙げることができる。

【0085】尚、前記のPCR反応装置は、標的核酸の熱変性反応、アニーリング反応、核酸の伸長反応を繰り返し行う装置(例えば、温度を $95^\circ\text{C}$ 、 $60^\circ\text{C}$ 、 $72^\circ\text{C}$ に繰り返し行うことができる。)である。また、検出システムは、蛍光励起用アルゴンレーザー、スペクトログラフならびにCCDカメラからなっている。更に、データ解析方法の各手順をプログラム化して、それを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体は、コンピュータにインストールされて使用され、コンピュータを介して上記のシステムを制御し、検出システムから出力されたデータを解析処理するプログラムを記録したものである。

【0086】コンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録されているデータ解析用プログラムは、サイクルごとの蛍光強度を測定する過程、測定された蛍光強度を、サイクルの関数として、すなわちPCRのamplification plotとしてコンピュータのディスプレイ上に表示する過程、蛍光強度が検出され始めるPCRサイクル数(threshold cycle number:Ct)を算出する過程、Ct値から試料核酸のコピー数を求める検量線を作成する過程、前記各過程のデータ、プロット値を印字する過程、からなっている。PCRが指數的に進行している場合、PCR開始時の標的核酸のコピー数の $\text{Log}$ 値と、Ctとの間には直線関係が成り立つ。従って標的核酸の既知量のコピー数を用いて検量線を作成し、未知コピー数の標的核酸を含有するサンプルのCtを検出することにより、標的核酸のPCR開始時のコピー数を計算できる。

【0087】c) 前記PCR方法で得られるデータを解析する方法、解析装置およびその解析をコンピュータに実行させるための解析手順をプログラムとして記録したコンピュータ読取可能な記録媒体などデータ解析方法等のPCR関連発明は、前記のようなリアルタイム定量的

PCR方法で得られたデータを解析する方法である。以下に各特徴について記す。第一の特徴は、リアルタイム定量的PCR方法で得られたデータを解析する方法において、各サイクルにおける増幅した核酸が蛍光色素と結合したとき、あるいは増幅した核酸が本発明の核酸プローブとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光強度値を、各サイクルにおける前記の蛍光色素と核酸が結合したものの、すなわち蛍光色素-核酸複合体、あるいは前記本発明の核酸プローブと標的核酸がハイブリダイズしたものの、すなわち核酸ハイブリッド複合体が解離したときの反応系の蛍光強度値により補正する演算処理過程、即ち、補正演算処理過程である。

【0088】「増幅した標的核酸が蛍光色素と結合したとき、あるいは増幅した標的核酸が本発明の核酸プローブとハイブリダイズしたときの反応系」とは、具体的に例示すると、PCRの各サイクルにおける40～85℃、好ましくは50～80℃の反応温度を有する核酸伸長反応あるいはアニーリングのときの反応系を挙げることができる。そして、反応が完了した反応系を意味する。実際の温度は増幅した核酸の長さに依存する。また、「前記の蛍光色素-核酸複合体、あるいは前記の核酸ハイブリッド複合体が解離したときの反応系」とは、PCRの各サイクルにおける核酸の熱変性の反応系、具体的には、反応温度90～100℃、好ましくは94～96℃のときのもので、反応が完了した系を例示できる。

【0089】補正演算処理過程の補正演算処理としては本発明の目的に合致するものであればどのようなものでもよいが、具体的には、次の〔数式1〕あるいは〔数式2〕による処理過程を含むものを例示することができる。

$$f_n = f_{hyb, n} / f_{den, n} \quad \text{〔数式1〕}$$

$$f_n = f_{den, n} / f_{hyb, n} \quad \text{〔数式2〕}$$

〔式中、

$f_n$ ：〔数式1〕あるいは〔数式2〕により算出されたn次サイクルにおける補正演算処理値、

$f_{hyb, n}$ ：n次サイクルにおける、増幅した核酸が蛍光色素と結合したとき、あるいは増幅した核酸が本発明の核酸プローブとハイブリダイズしたときの反応系の蛍光

$$\log_b (F_n)、\ln (F_n) \quad \text{〔数式5〕}$$

$$\log_b \{ (1 - F_n) \times A \}、\ln \{ (1 - F_n) \times A \} \quad \text{〔数式6〕}$$

$$\log_b \{ (F_n - 1) \times A \}、\ln \{ (F_n - 1) \times A \} \quad \text{〔数式7〕}$$

【0093】〔式中、

A、b：任意の数値、好ましくは整数値、より好ましくは自然数である。そして、 $A = 100$ 、 $b = 10$ のときは、 $\{ (F_n - 1) \times A \}$ は百分率(%)で表わされる。

$F_n$ ：〔数式3〕あるいは〔数式4〕により算出されたnサイクルにおける蛍光変化割合あるいは蛍光変化率〕、(3.2)前記(3.1)の演算処理値が一定値

強度値、

$f_{den, n}$ ：n次サイクルにおける、前記の蛍光色素-核酸複合体、あるいは核酸ハイブリッド複合体が解離したときの反応系の蛍光強度値〕

尚、本過程においては、上記の処理で得られた補正演算処理値をコンピュータのディスプレイ上に表示および／または当該値を各サイクル数の関数としてグラフの形で同様に表示および／または印字するサブステップを含むものである。

【0090】第二の特徴は、各サイクルにおける〔数式1〕あるいは〔数式2〕による補正演算処理値を次の〔数式3〕あるいは〔数式4〕に代入し、各サンプル間の蛍光変化割合あるいは蛍光変化率を算出し、それらを比較するデータ解析方法である。

$$\text{〔0091〕 } F_n = f_n / f_a \quad \text{〔数式3〕}$$

$$F_n = f_a / f_n \quad \text{〔数式4〕}$$

〔式中、

$F_n$ ：n次サイクルにおける、〔数式3〕あるいは〔数式4〕により算出された蛍光変化割合あるいは蛍光変化率、

$f_n$ ：n次サイクルにおける〔数式1〕あるいは〔数式2〕による補正演算処理値

$f_a$ ：〔数式1〕あるいは〔数式2〕による補正演算処理値で、 $f_n$ の変化が観察される以前の任意のサイクル数のものであるが、通常は、例えば、10～40サイクルのもの、好適には15～30サイクルのもの、より好適には20～30サイクルのものが採用される。〕

尚、本過程においては、上記処理で得られた算出値コンピュータのディスプレイ上に表示および／または印字する、または比較値もしくは当該値を各サイクル数の関数としてグラフの形で同様に表示および／または印字するサブステップを含むものであるが、〔数式1〕あるいは〔数式2〕による補正演算処理値については、上記サブステップを適用しても、しなくともよい。

【0092】第三の特徴は、(3.1)〔数式3〕あるいは〔数式4〕により算出された蛍光変化割合あるいは蛍光変化率のデータを用いて、〔数式5〕、〔数式6〕あるいは〔数式7〕による演算処理する過程、

$$\text{〔数式5〕}$$

に達したサイクル数を求める演算処理過程、(3.3)既知濃度の核酸試料におけるサイクル数と反応開始時の標的核酸のコピー数の関係式を計算する演算処理過程、(3.4)未知試料におけるPCR開始時の標的核酸のコピー数を求める演算処理過程、を有するデータ解析方法である。そして、(3.1)→(3.2)→(3.3)→(3.4)の順からなる過程が好適である。

【0094】前記(3.1)～(3.3)の各過程は、

それぞれの処理で得られた演算処理値をコンピュータのディスプレイ上に表示および／または当該値を各サイクル数の関数としてグラフの形で前記同様に表示および／または印字するサブステップを含むものであってもよい。前記(3.4)の過程で得られた演算処理値は、少なくとも印字される必要があるので、当該過程は印字するサブステップを含む。前記(3.4)で得られた演算処理値を更にコンピュータのディスプレイ上に表示してもよい。尚、〔数式1〕あるいは〔数式2〕による補正演算処理値、〔数式3〕あるいは〔数式4〕による算出処理値を、各サイクル数の関数としてグラフの形でコンピュータのディスプレイ上に表示および／または印字しても、しなくてもよいので、それらの表示および／または印字のサブステップは必要に応じて追加すればよい。

【0095】前記データ解析方法は、リアルタイム定量的PCR方法が蛍光色素の発光の減少量を測定するものである場合に特に有効である。その具体例として、前記の本発明のリアルタイム定量的PCR方法である。

【0096】第四の特徴は、リアルタイム定量的PCRの解析装置において、前記本発明のリアルタイム定量的PCR方法のためのデータ解析方法を実行する演算および記憶手段を有するリアルタイム定量的PCRの測定および／または解析装置である。

【0097】第五の特徴は、リアルタイム定量的PCRの解析装置を用いてPCRを解析するデータ解析方法の各手順をプログラム化して、そのプログラムを記録したコンピュータ読取可能な記録媒体において、前記本発明のデータ解析方法の各手順をコンピュータに実行させることができるようにしたプログラムを記録したコンピュータ読取可能な記録媒体である。

【0098】第六の特徴は、前記の本発明の核酸の融解曲線の分析方法、即ち、本発明のPCR方法を行って核酸の $T_m$ 値を求める方法によって得られるデータを解析する方法である。即ち、本発明のPCR法により増幅された核酸について、低い温度から核酸が完全に変性するまで、温度を徐々に上げる過程（例えば、50～95℃）、この過程において、短い時間間隔（例えば、0.2～0.5℃の温度上昇に相当する間隔）で蛍光強度を測定する過程、測定結果を時間の関数としてディスプレイ上に表示する過程、即ち、核酸の融解曲線を表示する過程、この融解曲線を微分して微分値（ $-dF/dT$ 、 $F$ ：蛍光強度、 $T$ ：時間）を得る過程、その値を微分値としてディスプレイ上に表示する過程、その微分値から変曲点を求める過程からなる、解析方法である。本発明においては、蛍光強度は温度が上がると増加する。本発明においては、各サイクルにおける核酸伸長反応時、好ましくはPCR反応終了時の蛍光強度値を熱変性反応時の蛍光強度値を用いて割る演算処理する過程を上記の過程に追加することにより、より好ましい結果が得られる。

【0099】前記の本発明の新規なPCR方法のデータ解析方法に、本発明の核酸の融解曲線の分析をする方法を追加してなる本発明のリアルタイム定量的PCRの測定および／または解析装置も本発明の技術的範囲内である。

【0100】更に、第七の特徴は、本発明の核酸の融解曲線の分析をする方法の各手順をコンピュータに実行させることができるようにしたプログラムを記録したコンピュータ読取可能な記録媒体、また、前記本発明のPCR方法のデータ解析方法の各手順をコンピュータに実行させることができるようにしたプログラムを記録したコンピュータ読取可能な記録媒体において、本発明の核酸の融解曲線の分析をする方法の各手順をコンピュータに実行させることができるようにしたプログラムを追加して記録したコンピュータ読取可能な記録媒体である。

【0101】本発明の前記のデータ解析方法、装置、および記録媒体は、医学、法医学、人類学、古代生物学、生物学、遺伝子工学、分子生物学、農学、植物育種学等の各種の分野で利用できる。また、複合微生物系、共生微生物系と云われ、色々の種類の微生物が混在するかもしれないが少なくとも一種の微生物が他の動物、植物由来の細胞と共に混在していて相互に単離できない微生物系等に好適に利用できる。ここで云う微生物とは一般的に云う微生物のことで、特に限定されるものではない。例えば、真核微生物、原核微生物、その他マイコプラズマ、ウイルス、リッケチャ等を挙げることができる。

【0102】また、本発明の前記データ解析方法、装置および記録媒体の一つまたはそれ以上を用いて、複合微生物系または共生微生物系における特定菌株の5S rRNA、16S rRNAもしくは23S rRNAまたはそれらの遺伝子DNAのコピー数を定量することにより、当該系における特定菌株の存在量を測定することができる。それは、5S rRNA、16S rRNAもしくは23S rRNAの遺伝子DNAのコピー数は菌株によって一定であるからである。本発明においては、複合微生物系または共生微生物系のホモジネートを用いて、本発明のリアルタイム定量的PCRを行い、特定菌株の存在量を測定することが可能である。この方法も、本発明の技術的範囲内とする。

【0103】

【実施例】次に実施例および比較例を挙げて本発明を更に具体的に説明する。

#### 実施例1

核酸プローブの合成：標的核酸Aの塩基配列をオリゴデオキシリボヌクレオチドからなる(5')tgc cat ccc ctc aat gg(3')として、本発明の核酸プローブの合成を次の順序で行った。

【0104】核酸プローブのデザイン：標的核酸の塩基配列が前記の通りであるから核酸プローブの塩基配列は簡単にオリゴデオキシリボヌクレオチドからなる(5')cc

a ttg agg gga tgg ca(3')と設計できた。また本発明の核酸プローブを以下のようにデザインした。5' 末端のリン酸にドナー色素BODIPY FL(Molecular Probes社、USA)を、5' 末端から4番目のチミンの塩基環の6位CのOH基にアクセプター色素BODIPY 581/591(Molecular Probes社、D-2228、USA)を標識するものとした(BODIPY FL-(5')cca (BODIPY 581/591)ttg agg gga tgg ca(3')なるデザイン: 核酸プローブ1)。

【0105】5'Amino-Modifier C6キット(Glen Research社、米国)を用いてチミジルのリン酸基をリンカー $-(CH_2)_6-SH$ で修飾した。Amino-Modifier C2dTキット(Glen Research社、米国)を用いてチミジンの塩基環の6位CのOH基をリンカー $-(CH_2)_7-NH_2$ で修飾した。これらの修飾チミジル酸およびチミジンを用いて、DNA合成機(ABI394)(株式会社パーキンエルマージャパンアプライド)を用いて、次の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。すなわち、 $HS-(CH_2)_6-(5')cca (H_2N-(CH_2)_7)-ttg agg gga tgg ca(3')$ の塩基配列をもつデオキシリボオリゴヌクレオチドで、5' 末端のリン酸基が前記リンカー $-(CH_2)_6-SH$ で、また5' 末端から4番目チミンの塩基環の6位CのOH基がリンカー $-(CH_2)_7-NH_2$ で修飾されている。なお、DNAの合成は $\beta$ -シアノエチルフォスホアミダイト(2-cyanoethylphosphoramidite)法で5' 末端TrONで行った。合成した後、保護基の脱離は28%アンモニア水で55℃、5時間で行った。

【0106】合成物の精製: 前記で得られた合成オリゴヌクレオチドを乾固し乾固物を得た。それを0.5M  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ 緩衝液(pH9.0)に溶解した。当該溶解物をNAP-10カラム(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。

【0107】アクセプター色素の標識: 前記ろ過物を乾固し、150 $\mu$ Lの滅菌水に溶解した(オリゴヌクレオチドA溶液)。1mgのBODIPY 581/591-NHS(Molecular Probes社、USA)を100 $\mu$ LのDMF(ジメチルホルムアミド)に溶解し、前記オリゴヌクレオチドA溶液、1M  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ バッファー150 $\mu$ Lを加え、攪拌後、室温で1晩反応させた。

【0108】合成物の精製: 前記反応物をNAP-25(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。次いで、2%TFAで保護基を脱離した。SEP-PAC  $C_{18}$ カラムを用いる逆相HPLCを行い、前記オリゴヌクレオチドのリンカー $-(CH_2)_7-NH_2$ にアクセプター色素BODIPY 581/591を結合させた目的物を分画した。分画物をNAP-10(ファルマシア社製)でゲルろ過した。

【0109】ドナー色素の標識: 前記ゲルろ過物を乾固し、150 $\mu$ Lの滅菌水に溶解した(オリゴヌクレオチドB溶液)。1mgのBODIPY FL-Chloride(Molecular Probes社、USA)を100 $\mu$ LのDMFに溶解し、前記オリゴヌクレオチドB溶液、1M  $NaHCO_3/Na_2CO_3$ バッファー150 $\mu$ Lを加

え、攪拌後、室温で1晩反応させ、5' 末端のリンカー $-(CH_2)_6-SH$ にドナー色素BODIPY FLを結合させた。

【0110】合成物の精製: 前記反応物をNAP-25(ファルマシア社製)でゲルろ過を行い、未反応物を除去した。前記同様の逆相HPLCを行い、5' 末端より4番目のチミン塩基に前記アクセプター色素BODIPY 581/591を結合させたオリゴヌクレオチドで、かつ5' 末端にドナー色素BODIPY FLを付加した本発明の核酸プローブ、すなわち、ドナー色素とアクセプター色素で標識された本発明の核酸プローブ1を得た。なお、本発明の核酸プローブは前記アクセプター色素を結合させたオリゴヌクレオチドより遅れて溶出された。

【0111】本発明の核酸プローブの定量は、分光光度計で260nmの値を測定することにより行った。また、当該プローブについて、分光光度計を用いて650~220nmの吸光度のスキャンを行った結果、BODIPY FL、BODIPY 581/591、DNAの吸収があることを確認した。さらに、前記同様の逆相HPLCで精製物の純度検定を行った結果、シングルピークであることを確認した。

【0112】なお、上記の逆相クロマトグラフィーの条件は次の通りである:

溶出溶剤A: 0.05N TEAA 5% $CH_3CN$

溶出溶剤B(グラジエント(gradient)用): 0.05N TEAA 40% $CH_3CN$

カラム: SEP-PAK  $C_{18}$ ; 6 $\times$ 250mm

溶出速度: 1.0ml/min

温度: 40℃

検出: 254nm

【0113】実施例2

アクセプター色素BODIPY 581/591のみ標識したプローブ $-(5')cca (BODIPY 581/591)ttg agg gga tgg ca(3')$ (核酸プローブ2)の合成: 5' 末端のリン酸基にドナー色素BODIPY FLで標識する操作を除く以外は核酸プローブ1と同様な操作で合成した。

実施例3

ドナー色素BODIPY FLのみ標識したプローブ $-(BODIPY FL)(5')cca ttg agg ggatgg ca(3')$ (核酸プローブ3)の合成: 5' 末端のリン酸基にアクセプター色素BODIPY 581/591で標識する操作を除く以外は核酸プローブ1と同様な操作で合成した。

【0114】実施例4

標的核酸の合成: 前記のオリゴヌクレオチドの合成と同様に、 $(5')tgc cat ccc ctc aat gg(3')$ なる塩基配列のオリゴヌクレオチドを合成して、本発明の標的核酸とした。

【0115】実施例5

標的核酸に本発明のプローブをハイブリダイズさせた反応系の蛍光強度測定: 石英セル(10mm $\times$ 10mm)(容量4mL)に500 $\mu$ L緩衝液(120mM NaCl(終濃度30mM)、120mM T

ris-HCl(終濃度30mM;pH=7.2)を添加し、次に1460 $\mu$ Lの滅菌蒸留水を添加し攪拌した。そこに、8.0 $\mu$ Lの本発明の核酸プローブ1または核酸プローブ2(10 $\mu$ M)溶液を添加して(核酸プローブ終濃度40nM)攪拌した。30℃に保温して蛍光波長をスキャンした(励起波長:490nm(8nm幅))、測定蛍光波長:580nm(8nm幅)。ついで、反応系を60℃に制御した後、10 $\mu$ M濃度の標的核酸溶液32.0 $\mu$ Lを添加し(標的核酸終濃度160nM)、攪拌した。そして蛍光波長をスキャンした。ついで、温度を3

0℃に制御して核酸プローブと標的核酸をハイブリダイズさせ、蛍光波長をスキャンした。その結果を表1および2に示した。なお、恒温セルホルダーとして、東京理科機器(株)製晶析用プログラム低温循環装置PCC-7000を使用してセルの温度(反応温度)を制御した。また、蛍光測定はパーキンエルマー社製蛍光光度計LS50Bを使用した。

【0116】

表1:ハイブリダイゼーション(HYB)前後の580nmにおける蛍光強度変化(励起490nm)

実験系	HYB 前 (60℃)	HYB 後 (30℃)	蛍光強度減少量	減少率(%)
核酸プローブ1 + 標的核酸	24.82	4.10	20.72	83.5
核酸プローブ2 + 標的核酸	0.51	0.55	-0.04	-107.8

HYB:ハイブリダイゼーション

蛍光強度減少量:HYB前蛍光強度値-HYB後蛍光強度値

減少率:蛍光強度減少量/HYB前蛍光強度値

【0117】

表2:ハイブリダイゼーション(HYB)前後の510nmにおける蛍光強度変化(励起490nm)

実験系	HYB 前 (60℃)	HYB 後 (30℃)	蛍光強度減少量	減少率(%)
核酸プローブ1 + 標的核酸	10.5	7.8	2.7	25.71
核酸プローブ3 + 標的核酸	55.56	9.6	45.96	82.72

HYB:ハイブリダイゼーション

蛍光強度減少量:HYB前蛍光強度値-HYB後蛍光強度値

減少率:蛍光強度減少量/HYB前蛍光強度値

【0118】表1においてはアクセプター色素BODIPY 581/591の蛍光強度を測定したものであり、表2においてはドナー色素の蛍光強度を測定したものである。表1から次のことが分かる:すなわち、ハイブリダイゼーション前のアクセプター色素の蛍光強度は、核酸プローブ1+標的核酸の実験系において、核酸プローブ2+標的核酸の実験系のものに比較して極端に高いことがわかる。これは、核酸プローブ1においては、ドナー色素であるBODIPY FLとアクセプター色素であるBODIPY 581/591の間でFRET現象がおり、アクセプター色素が発光したことによるものである。一方核酸プローブ2では分子内にドナー色素を有さないために、FRET現象が発生せ

ず、蛍光を発することがなかった。

【0119】ハイブリダイゼーション後において、核酸プローブ1+標的核酸の実験系において、大きく減少した。核酸プローブ2+標的核酸の蛍光強度の実験系のものは、殆ど変化なかった。これは、核酸プローブ1と標的核酸がハイブリダイズしたことにより、ドナー色素がGC水素結合体に接近したために、エネルギーがGC水素結合体の方に転移したためである。

【0120】表2からは次のことが分かる:ハイブリダイゼーション前のドナー色素の蛍光強度は、核酸プローブ1+標的核酸の実験系において、核酸プローブ2+標的核酸の実験系のものに比較して極端に高いことがわか

る。これは、核酸プローブ1においては、ドナー色素であるBODIPY FLとアクセプター色素であるBODIPY 581/591の間でFRET現象がおり、ドナー色素のエネルギーがアクセプター色素の方へ転移したことによるものである。一方核酸プローブ3では分子内にアクセプター色素を有さないために、FRET現象が発生せず、蛍光を発したことによる。

【0121】ハイブリダイゼーション後において、核酸プローブ1+標的核酸の実験系において、僅かに減少したのみである。これは、標的核酸にハイブリダイズしたことにより、ドナー色素がGC水素結合体に接近したために、そのエネルギーがアクセプター色素からGC水素結合体の方に転移したためである。一方、核酸プローブ3+標的核酸の蛍光強度の実験系のものは、著しく減少した。これは、標的核酸にハイブリダイズしたことにより、ドナー色素がGC水素結合体に接近したために、発光に費やしていたエネルギーがGC水素結合体の方に転移したためである。表1および2から分かるように、本発明の核酸プローブは、標的核酸にハイブリダイズするとドナー色素およびアクセプター色素の蛍光強度が共に減少するように設計されたものである。

#### 【0122】実施例6

実施例1、2、3および4と同様にして、標的核酸B：(5')aacgatgccatggatttg(3')なる塩基配列のオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成した。また、前記実施例

と同様にして、アクセプター色素としてX-ローダミンを、ドナー色素としてBODIPY FLを標識し、前記標的核酸Bにハイブリダイズする本発明の核酸プローブ4を作製した。核酸プローブ4は下記の構造を有した：BODIPY FL-(5')ccaaat(X-Rhodamine)ccatggcatcatt(3')。

【0123】標的核酸AおよびBが存在する測定系に、本発明の核酸プローブ1および4を添加し標的核酸Aと核酸プローブ1を、および標的核酸Bと核酸プローブ4をハイブリダイズさせた反応系の蛍光強度測定：石英セル(10mm×10mm)(容量4mL)に500μL緩衝液(120mM NaCl(終濃度30mM)、120mM Tris-HCl(終濃度30mM; pH=7.2)を添加し、次に1460μLの滅菌蒸留水を添加し攪拌した。そこに、8.0μLの本発明の核酸プローブ1および核酸プローブ4(10μM)溶液を添加して(核酸プローブ終濃度40nM)攪拌した。45℃に保温して蛍光強度を測定した。(プローブ1：蛍光測定波長、580nm(5nm幅)；プローブ4：測定波長、610nm(5nm幅)；励起波長(共通)：490nm(8nm幅))。ついで、表3に示した各濃度について標的核酸AおよびBの各溶液32.0μLを添加し、攪拌した。そして蛍光強度を測定した。その結果を表3に示した。なお、恒温セルホルダー、蛍光測定装置等は前記実施例と同様なものを使用し、方法も前記実施例と同様に行った。

#### 【0124】

表3：ハイブリダイゼーション(HYB)前後の580nmおよび610nmにおける蛍光強度変化(前者の励起490nm、後者の励起490nm)

実験系	標的核酸濃度(μM)	HYB前(45℃)	HYB後(45℃)	蛍光強度減少量	減少率(%)
580nm (標的核酸A)	0	110	108	2	1.8
	20	107	67	40	37.4
	40	101	30	71	70.2
	60	98	22	76	77.7
610nm (標的核酸B)	0	80	85	-5	-0.6
	20	75	50	25	33.3
	40	80	28	52	65.0
	60	76	18	58	76.3

HYB：ハイブリダイゼーション

蛍光強度減少量：HYB前蛍光強度値-HYB後蛍光強度値

減少率：蛍光強度減少量/HYB前蛍光強度値

【0125】表3から分かるように、580nmおよび610nmにおける蛍光強度は、ハイブリダイゼーション後は添加した標的核酸濃度に応じて減少している。励起光

490nmの場合、580nmの蛍光強度は本発明のプローブ1のものであり、610nmのものは本発明のプローブ4のものである。このように、測定系に複数の標的核



酸が存在していても、本発明の核酸プローブとそれを用いた核酸測定方法を用いることにより、複数の標的核酸を同時にかつ簡便に測定できることが分かる。

【0126】

【発明の効果】前記のように本発明の核酸プローブは構成されているので、標的核酸にハイブリダイズすると、蛍光強度がハイブリダイゼーション前後で、ドナー色素およびアクセプター色素の蛍光強度が共に顕著に減少するので、標的核酸を微量でしかも、正確かつ簡便、短時間に測定できる。また、ドナー色素は、エネルギーがGC水素結合体の方に転移できるものであるため、その種類が限定されるが、アクセプター色素はそのような性質

がなくともよいので、エネルギー転移を受ける性質を有していれば、種々の色素が利用できる。ということは、本発明において一つのドナー色素（一つの励起波長）で種々の蛍光色を発する（蛍光波長の異なる）核酸プローブを製作できることになる。このことは、多種類の核酸を測定する核酸測定装置において、励起用レーザー種類を備えておればよいので、励起するための光学系を単純にする。すなわち核酸測定装置の設計・製作も容易になる。また、励起用レーザーが一波長しかない単純な核酸測定装置でも多種類の核酸プローブを使用できるので、多種類の標的核酸を同時に測定できる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
G O 1 N 33/566		G O 1 N 33/58	A
33/58		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(72)発明者 金川 貴博		(72)発明者 山田 一隆	
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内		東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内	
(72)発明者 鎌形 洋一		(72)発明者 横幕 豊一	
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内		東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内	
(72)発明者 鳥村 政基		F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01	
茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所 つくばセンター内		FA03 FA06 GA07 GB07 GB21	
(72)発明者 蔵田 信也		KA02 KA05 KA09 LA01 NA01	
東京都千代田区東神田1-9-8 環境エンジニアリング株式会社内		2G045 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13	
		DA14 FA29 FB02 FB07 FB12	
		GC15	
		4B024 AA11 CA09 HA14	
		4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ52	
		QR32 QR56 QS34 QS36 QX02	